

PCT P 97 / 0 0 62 7

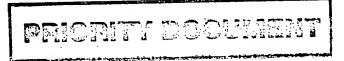
REC'D 1 4 MAR 1997

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO EL DELL' DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

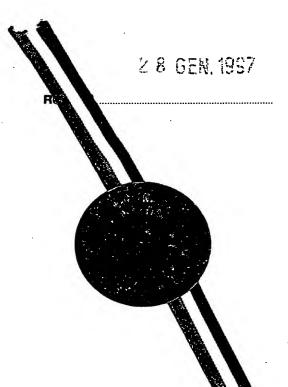


Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per ....

N. MI96 A 000277



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito



IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERYE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO  ANDICIDENTE DI CALIFORIO (INCIPE)  Di Desconinacione (CALIFORIA (INCIPE))  Residento (CALIFORIA (INCIPE))  RESIDENTA (INCIPE)	AL MINISTERO, I UFFICIO CENTRALE	DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DEI L'ARTICIANATO	MODULO Á mu a
Disconsideration  Finalization  Finalization	OMANDA DI BREVE	TTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBI	ILITÀ AL PUBBLICO
Residence VCCENTA (VT)/T codes Games			L ~ ~ ~ ~ ~ N.G.
2) Descrinations  Repletation and Control of Republic Control of Section Control of Secti	1) Denominazione L	CAMBON GROUP D.p.A.	[3]
Representation to studied in sportnesses 2.24 MBON GROUP S.D.A.  **Compose near 2.24 MBON GROUP	Residenza L	VICENZA (VI)/I	J codice L如何仮会1950240++++
RAPPRESENTANTE DIL RICHIOCHTE PRESSO L'U.C.B.  COSCORDING SORDE ALLEGATA  THOLO  CHARLES TO BETTIMATARIO  CHARLES TO CONTROL C	2) Denominazione L		
RAPPRESENTANTE DEI NICHEDERTE PRESSO L'U.C.B.  COSPONOS ROME DE L'ALLES AND SECTION GROUP S.D.A.  VILLIZO (191 DUCE)   S. L'ALLES (191 DUCE)   S. L'AL	Residenza		
cognose some PANUSSAN SECTION  decominations studied disparaments ZAHEDIN GROUP S. D. A.  "LILLE (121 DUE)  "A LILL (121 DUE)	DADDDECENTANTE	IC) DIGUIERCHE PRESSO AND R	, country
### COMMENTATIONS ALEGATA  **********************************			
TITOLO CLASS PROPERTO LA LICOL CHES BRESSO CO DO LA COLUMNATO DESTINATARIO CHES PROPERTO CALCULARIO DESTINATARIO CHES PROPERTO CALCULARIO CALCU	- Ā		cod. fiscale
DOMICIJO ELETTIVO DESTINATARIO   Cassa proparas (saliditas)  LAGIZ grapo-instingropo 131/LOGI  COTIPOSIZIONE FAVINA-CULTICA ATLA ACI INDITE LA FORMAZIONE AI meta  TUMORAL  COMPOSIZIONE FAVINA-CULTICA ATLA ACI INDITE LA FORMAZIONE AI meta  TUMORAL  TICIPATA ACCESSIBILITA AL PUBBLICO: SI   NO L  SE ISTANZA DATA   /                              INVENTORIO DESIGNATI  Coapones none			
TITICLO  classe proposite (sability)  LAGLIX purpoprintingnuppo  L31/L001  TEUMOTAL  COTIDOSICIONE 122720 PULIFICA ALLE ACT ACT ACCESSIBILITA AL PUBBLICO: SI   NO   X  TEUMOTAL ACCESSIBILITA AL PUBBLICO: SI   NO   X  SEISTANZA DATA   /   /   /   Nº PROTOCOLLO   1  Nº PROTOCOLLO   Nº PR	AIS TTTO	del Duca n. Life dim BRESSO	cap [20091 (prov) [11
TOTOLO Classes proporto (sazidinal) ALELIX grouppointenapropose 31/100   TELIZA CONTROLLIC ACTUAL AND INDICATE ACCESSIBILITA AL PUBBLICO: SI   NO   X SE ISTANZA: DATA     /       N PROTOCOLLO	DOMICILIO ELETTIVO	DESTINATARIO	
COMPOSIZIONE TARMA CELLICA ALLEGATA  INVESTIONI DESIGNATI  Cognome some  3)  3)  PRIORITA  INVESTIONI DESIGNATI  Cognome some  3)  3)  PRIORITA  INVESTIONI DESIGNATI  CONTROLLE  STOCKLIMENTO RISERV  By Carlor  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  By Carlor  By Carlor  By Carlor  CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione  ARROTAZIONI SPECIALI  ARROTAZIONI SPECIALI  CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione  ARROTAZIONI SPECIALI  ARROTAZIONI SPECIALI  CINENTIAZIONE ALLEGATA  N. L.  CINENTIAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  ARROTAZIONI SPECIALI  CINENTIAZIONE ALLEGATA  N. L.  CINENTIAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  N. L.  CINENTIAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  N. L.  CINENTIAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  N. L.  CINENTIAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  N. L.  CINENTIAZIONE ALLEGATA  ARROTAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  ARROTAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  ARROTAZIONE SERVINA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  STOCKLIMENTO RISERV  Dets  CINENTIAZIONE ALLEGATA  ARROTAZIONE RISERV  CONTINUENTA	Via		cap (prov)
COTIDOSICIONE PARMA CELLICA ATTA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI LINO LE CENTRO DESIGNATI CENTRO DE SIGNATI CENTRO DE SIGNATIVA CONTRO DE CONTRO DE SIGNATIVA CONTRO DE CONTRO	TITOLO	classe proposta (sez/cl/scl) LA.6.1.7 gruppo/sottogruppo L13.1/1	
TRICIPATA ACCESSIBILITA AL PUBBLICO: SI   NO   X SE ISTANZA DATA     /     No PROTOCOLLO       No PROTOCOLLO     No PROTOCOLLO     No PROTOCOLLO     No PROTOCOLLO     No PROTOCOLLO     No PROTOCOLLO     No PROTOCOLLO       No PROTOCOLLO     No PR	Composizi		-
TICIPATA ACCESSIBILITA AL PUBBLICO: SI   NO   X   SEISTANZA: DATA	-		The Habitas
INVENTORI DESIGNATI  2)  PRIORITA  RADICIOS O GIURNIZZAZIONE  BISPO di priorità  NUMENTAZIONE ALLECATA  R. 12.  CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI. denominazione  AMMOTAZIONI SPECIALI  CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI. denominazione  AMMOTAZIONI SPECIALI  CIURNITAZIONE ALLECATA  R. 12.  CIURNITAZIONE ALLECATA  R. 12.  CIURNITAZIONE ALLECATA  R. 12.  CIURNITAZIONE ALLECATA  R. 13.  CIURNITAZIONE ALLECATA  CIURNI			
INVESTOR DESIGNATI  CONCORDE SOME  PRIORITA  RADIORE D. OTGENIZZZIONE  Deta  Deta  Priorità  NUMERIAZIONE ALLEGATA  N. 22.  CENTRO ABLILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI. denominazione  ARROTAZIONE ALLEGATA  N. 23.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 24.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 24.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 25.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 27.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 28.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 29.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 20.  CIUMENTAZIONE ALLEGATA  CIUMENTAZIONE ALLEGAT			
INVENTORI DESIGNATI  2)  2)  4)  PRIORITA  RADIONE O ORGANIZAZIONE  Dispo di priorità  NUMERTAZIONE ALLEGATA  RANDOTAZIONI SPECIALI  DIMENTAZIONE ALLEGATA  N. 12.  2)  1) LPEDE IN LONG IN LO	TICIPATA ACCESSIBIL	JTA AL PUBBLICO: SI U NO LX SFISTANZA DATA   1/1	No PROTECTION
PRIORITA  Ratices o organizzazione  bipo di priorità  Dumero di domande  diria di depositio  SR  Deta  Nº Pro  Det		SE ISTANCE. SAIN CONTRACTOR OF THE SECONDARY CONTRACTOR OF	cognome nome
PRIORITA  ABJORDO O Organizzazione  tipo di priorità  nomero di domando  data di deposito  S.R  Deta  N. Provi  Deta  N. Provi  LI ILIZZAZIONE  DETA  DETA  DETA  DETA  N. Provi  DETA  DETA  DETA  DETA  N. Provi  DETA  S. DOGLIMENTO RISENVA  DETA  DETA  S. DOGLIMENTO RISENVA  DETA  N. Provi  Deta  N. Provi  Deta  N. Provi  Deta	1). [		
DESTINATE  TO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF ROUTE OF PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF ROUTE OF PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF ROUTE OF PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF ROUTE OF PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF ROUTE OF PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF ROUTE OF PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  ANIONALISTO OF PROV	2)	4	
Deta ipped i priorità numero di domanda data di depesitio M. Ne Provincia i per di priorità numero di domanda data di depesitio M. Ne Provincia i per di priorità numero di domanda data di depesitio M. Ne Provincia i per di priorità dell'All'All'All'All'All'All'All'All'All'	PRIORITA		SCHOOL IMPACTO RISERVE
CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione  AMMOTAZIONI SPECIALI  AMMOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  IL DEPOSITANTE  AMMOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE	nazione o organizza:		allegato
CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione  ARMOTAZIONI SPECIALI  CUMENTAZIONE ALLEGATA  N. e.:  1) L. P. CERU n. pag. P. I. rissuunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatario I esamplare)  2) L. TERUY n. tav. L. disegno (obbligatorio se citato in descrizione I esamplare)  3) L. D.	n l		
AMNOTAZIONI SPECIALI  SUMENTAZIONE ALLEGATA  N. es.  1) LP PROV. n. pag. LP rissaunto con disagno principala, descrizione e rivendicacioni (obbligaturio 1 e semplare)  1) LP PROV. n. tav. L. disagno (obbligaturio se citato in descrizione)  1) LB PROV. n. tav. L. disagno (obbligaturio se citato in descrizione)  1) LB BB descriptore descrizione e rivendicacioni (obbligaturio 1 e semplare)  1) LB BB designazione inventore:  1) LB BB descriptore process generale  2) LB BB descriptore a citato in descrizione. I esemplare  4) LD BB designazione inventore:  3) LB BB descriptore process generale  4) LD BB designazione inventore:  5) LB BB descriptore a citato in descrizione. I esemplare  4) LD BB designazione inventore:  5) LB BB descriptore del richiedente  6) LB BB surforizzazione o atto di cressione  6) LB BB surforizzazione o atto di cressione  7) Loon la confinenti single priorità  8) LB BB surforizzazione o atto di cressione  9) LB BB surforizzazione o atto di cressione  10) LB BB surforizzazione o atto di cressione  11) LB			
UMENTAZIONE ALLEGATA  N. *a.  1) L. C. ESSUY n. pag. L. P. risassunto con disagno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligaturio 1 estemplare)  2) L. PESUY n. tav. L. disegno (obbligaturio se citato in descrizione, 1 estemplare)  3) L. ESS descrizione e rivendicazioni (obbligaturio 1 estemplare)  4) L. D. RES designazione inventore  designazione inventore designazione inventore  designazione o stro di cessione  7) L. noninativo competto del richiedante  attestato di versamento, totale lire  CTNOUTECENTOSESSANTACTNOUTEMILA **  TRIBADORI  N. iscriz. Albo 282  10 PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  11 29 6 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)  Stefano Panossian  N. iscriz. Albo 282  11 20 PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI  12 3 1 2 10 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0			
AMNOTAZIONI SPECIALI  SUMENTAZIONE ALLEGATA  N. es.  1) LP PROV. n. pag. LP rissuuto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esamplaro)  3) LR RS  letteres d'incurisco-procure conferimento procura generale  4) LD BRS  designazione inventure  designazione inventure  designazione inventure  designazione inventure  designazione inventure  in taliane  confronta singule priorità  confronta singu	CENTRO ABILITATO D		
ANNOTAZIONI SPECIALI    COMMENTATIONE ALLEGATA   SCIOGLIMENTO RISERVE   Data   No. 12.		MARKE	7.7548999
CUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 9.  L. PROV n. p.g. Pl rissuunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  1. PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  2 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  3 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  4 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  4 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  5 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  6 PROV designazione inventore  6 PROV designazione inventore confronta singole priorità  6 PROV nominativo completo del richiedente  7 nominativo completo del richiedente  8 ALLE DI DESCRIZIONE CONTROLLE MARCOLLE MARC	ANNOTAZIONI SPECIA	u	\$5000 at 1
CUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 9.  L. PROV n. p.g. Pl rissuunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  1. PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  2 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  3 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  4 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  4 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  5 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  6 PROV designazione inventore  6 PROV designazione inventore confronta singole priorità  6 PROV nominativo completo del richiedente  7 nominativo completo del richiedente  8 ALLE DI DESCRIZIONE CONTROLLE MARCOLLE MARC			
CUMENTAZIONE ALLEGATA  N. 9.  L. PROV n. p.g. Pl rissuunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  1. PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  2 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  3 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  4 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  4 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  5 PROV n. tav disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  6 PROV designazione inventore  6 PROV designazione inventore confronta singole priorità  6 PROV nominativo completo del richiedente  7 nominativo completo del richiedente  8 ALLE DI DESCRIZIONE CONTROLLE MARCOLLE MARC			
UMENTAZIONE ALLEGATA  N. sz.  1)			QUEMILA
N. s. 1.			TOTAL PROPERTY OF THE ISOUR
1)   PROV   n. pag   PI   risssunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio I esamplare)	UMENTAZIONE ALLEC	GATA	CONTRIBUTION DISEBUTE
2) PROV n. tav. disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare  3) LESS designazione inventore  4) LO BSS designazione inventore  designazione inventore  4) LO BSS designazione inventore  designazione o atto di cessione  autorizzazione o atto di cessione  7) Lonominativo compteto del richiedente  attestati di versamento, totale lire  CINQUECENTOSESSANTACTNQUENTILA SE  prilato il LOP 1996 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)  Stefano Panossian  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI Milano  prilanovecento NOVANTASEI RICHIEDE COMM. ART. DI Milano  millanovecento NOVANTASEI RICHIEDE COMM. LICHIEDE COMM. LICHIE	N. es.		
Stefano Panossian   Stef	1) LE [PROV]	n. pag. [2] risssunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)	[ [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
designazione inventore    A	2) PROV	n. tav. disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare	[11]/[1]/[1]/[1]
document di priorità con traduzione in italiane  sutorizzazione o atto di cessione  nominativo completo del richiedente  confronta singole priorità  confronta singole priorita singole priorità  conf	3) [ RIS	letters of incaracy procure or iferimento procure generale	المارايدا / إما / إما / إما المارايدات
document di priorità con traduzione in italiane confronta singole priorità    Si	4) 🖺 📆		OH, OH, YOUR R 1931
autorizzazione o atto di cessione  nominativo completo del richiedente  attestati di verzamento, totale lire CINQUECENTOSESSANTACTNOUEMILA**  marche da bollo per attestato di brevetto di lire  PILATO IL 17/07/1996 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)  Stefano Panossian  PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI 11 and cod  Cod  ALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA NI 96/A 000277 Reg.A  D millenovecento NOVANTASE I BI giorno del mese di ichiedente (i) sopreindicato (i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. LO Ogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopreripi  NNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  IL DEPOSITANTE			
attestati di versamento, totale lire CINQUECENTOSESSANTACTNOLIENTI, A = 2  marcha da bollo per attestato di brevetto di lire  marcha da bollo per attestato di brevetto di lire  presente alto si richiede copia autentica si/no SI  Stefano Panossian  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MI I and Complete in the control of the control			
attestati di versamento, totale lire  CINQUECENTOSESSANTACTNOLIEMIT, A **  marche da bollo per attestato di brevetto di lire  PILATO IL 12 02 1996 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)  Stefano Panossian  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI Milano  CIO PROVINCIALE IND. CO	·		
marche de bollo per attestato di brevetto di lire  PILATO IL 12001296 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)  Stefano Panossian  PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI Milano  CIO PROVINCIALE IND. COMM.	7) 📙 .	_	
PILATO IL 19 09 1996 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I) Stefano Panossian  PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MITARO  ALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI 96/A 000277 Reg.A  D millenovecento NOVANTASE I SI Giorno DI CI FEBBRA  D millenovecento NOVANTASE I SI Giorno DI CI FEBBRA  Dichiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. L. Q. Quelli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripa  NNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  L'UFFICIALE ROGANTE	attestati di versamento, t	male line CINQUECENTOSESSANTACTHQUEMITA # #	obbligatorio
Stefano Panossian  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO  ALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI 96/A 000277  In aga a provinciale indicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. LO Qui aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripi  IL DEPOSITANTE  L'APFICIALE ROGANTE	marche da bollo per atte	sstato di brevetto di lire	obbligatorio
Stefano Panossian  N. iscriz. Albo 282  CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO  ALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI 96/A 000277  In aga a provinciale indicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. LO Qui aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripi  IL DEPOSITANTE  L'APFICIALE ROGANTE	PILATO IL LAPL	09 1996 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (D	1
CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO COMMININA MILANO COMININA MILANO COMMININA MILANO COMMININA MILANO COMININA MILANO COMININA MILANO C	. 270		nossian
CIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO COMMANDA NI 96/A 000277 Reg.A.  O MILE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA NI 96/A 000277 Reg.A.  O MILE DI DEPOSITO NOVANTASE I GIORNO COMMANDA NI 96/A 000277 Reg.A.  O MILE DI DEPOSITANTE  IL DEPOSITANTE  L'AFFICIALE ROGANTE		N isomin A	lbo 282
ALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA NI 96/A 000277 Reg.A  NOVANTASE I REBBRA  chiadente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. LQQgli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripi  NNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  IL DEPOSITANTE	HESENIE ATTO SI KIC	HIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO LDJ.	
ALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA NI 96/A 000277 Reg.A NOVANTASE I SI giorno Supraripa del mese di CARDICI FEBBRA di ichiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presenta domanda, corredata di n. Li Qi Qogli aggiuntivi per la concessione del bravetto sopraripa NNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  IL DEPOSITANTE		Milano	16
NOVANTASE I GUITADE QUATTORDICI FEBBRA  o millenovecento NOVANTASE I Ji giorno GUITADE QUATTORDICI FEBBRA  ichiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. Li Qi Qi aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripi  NNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  IL DEPOSITANTE	CIO PROVINCIALE IND	. COMM. AHT. DI	codice codice
o millenovecento	ALE DI DEPOSITO	neg.A	
ichiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. LIQ @gli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripi NNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE  IL DEPOSITANTE	o millenovecento	NOVANTASEI Jil giorno COLLEGE TOUAT	
IL DEPOSITANTE			and the second s
IL DEPOSITANTE  L'AUFFICIALE ROGANTE			uvi per la concessione del brevetto sopramportato.
	MHOTAZIONI VARIE DI	ELL'UFFICIALE ROGANTE	
, without # 1 E # # #	IL DEPO		L'HFFICIAL ROBANTE
dell'Ufficio COPTONESI MACRIZIO	Street Line	doll'I Milata	PROVESI MANIRIZIO

RIASSUNT INVENZIONE CON DISEGN PRINCIPAL	LE. DESCRIZIONE S RIVENDICAZIONE		
NUMERO DOMANDA !Xi 20 A000 0734	REG B	DATA DI UEPOSITO MANDEN ME	
NUMERO BREVETTO		DATA DI RILASCIO	• • • • •
<sup>в. πποιο</sup> Composizione farmaceutica atta a	d inibire la formazione di	metastasi tumorali	
		MARÇA DA BOLLO	
		5000 - MARCADABOL	
L. RIASSUNTO		GNOUEMHAR ELEZIL PREED LIRE 1500	5 P 5 P 5 P 10 P
L'associazione terapeutica di N-ac	cetil-cisteina con Doxorubi	cina mostra un notevole eff	etto sinergico
nell'inibizione della formazione di	metastasi tumorali.		
Vengono descritte composizioni	farmaceutiche che conte	ngono l'associazione e kit	idonei per la
somministrazione dei due farmaci.			
			•
A. DISEGNO			
M. DISEGNO			-, •
· ·			
	•		



"Composizione farmaceutica atta ad inibire la formazione di metastasi tumorali"

## Descrizione

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica ad attività antitumorale e più in particolare riguarda un'associazione tra Doxorubicina ed Nacetil-cisteina particolarmente utile nel combattere la diffusione di metastasi tumorali.

La N-acetil-cisteina (The Merck Index, 11a Ed., N. 82, pag. 14) (d'ora in avanti indicata più brevemente come NAC) è un noto farmaco precursore del glutatione ridotto (GSH) al quale, negli ultimi anni, sono state riconosciute utili proprietà nella prevenzione dei tumori [De Flora S. et al., J. Cell. Biochem. Suppl., 22, 33 (1995)].

La NAC è in fase di sperimentazione clinica per quest'ultimo uso [Kelloff G.J. et al., J. Cell. Biochem. Suppl., 20, 63 (1994)].

Recenti studi hanno anche evidenziato come la NAC possa esercitare meccanismi protettivi anche nelle fasi più avanzate di cancerogenesi (invasione e metastasi) [Albini A. et al., Int. J. Cancer, 61, 121 (1995)].

La Doxorubicina (The Merck Index, 11a Ed., N. 3428, pag. 540) (d'ora in avanti indicata brevemente come DOX) è un antibiotico antraciclinico dotato di attività antitumorale ed ampiamente usato in terapia.

L'impiego della DOX è limitato dal fatto che essa può causare cardiopatie congestizie potenzialmente letali.

E' stato evidenziato come la NAC sia in grado di attenuare la cardiotossicità della DOX nei topi senza ridurne l'efficacia terapeutica. [Doroshow J.H. et al., J. Clin. Invest., 68, 1053 (1981)].

Abbiamo ora sorprendentemente trovato che esiste un sinergismo tra NAC e DOX



nell'inibizione della formazione di metastasi tumorali.

Costituisce pertanto oggetto della presente invenzione una composizione farmaceutica contenente N-acetil-cisteina e Doxorubicina in quantità efficaci nel manifestare un effetto sinergico nell'inibizione della formazione di metastasi tumorali.

Costituisce un secondo oggetto della presente invenzione un kit comprendente Nacetil-cisteina e Doxorubicina in quantità sinergisticamente efficaci nell'inibizione
della formazione di metastasi tumorali nonché un mezzo idoneo per la loro
somministrazione.

Costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione un processo per la preparazione di una composizione farmaceutica contenente N-acetil-cisteina e Doxorubicina per l'inibizione della formazione di metastasi tumorali.

L'attività inibente la formazione di metastasi tumorali è stata valutata nell'animale da esperimento sia in 4 studi di metastasi sperimentali che in 4 studi di tumorigenicità e metastasi "spontanee".

Il dettaglio degli esperimenti è riportato nell'esempio 1.

In generale il trattamento con solo DOX non ha ridotto significativamente il numero di metastasi rispetto ai controlli negli esperimenti eseguiti, se non alla dose di 10 mg/kg peso corporeo iniettata e.v. (metastasi sperimentali) ed alla dose di 2 mg/kg peso corporeo iniettata i.p. (tumorigenicità e metastasi spontanee).

Negli esperimenti di metastasi sperimentali la NAC da sola ha ridotto significativamente il numero di metastasi solo quando somministrata congiuntamente alle cellule tumorali infestanti mentre ha dimostrato effetti protettivi significativi in tutti gli esperimenti di tumorigenicità e metastasi spontanee.



Un notevole effetto sinergico è stato invece osservato in ambedue i tipi di studi, somministrando sia NAC che DOX, e questo effetto risulta essere particolarmente elevato quando la DOX viene somministrata per via endovenosa.

La NAC può essere somministrata sia oralmente che per via endovenosa anche congiuntamente alla DOX.

Negli aspetti pratici del trattamento, la NAC e la DOX vengono preferibilmente somministrate congiuntamente in una opportuna composizione farmaceutica.

Esempi di specifiche forme farmaceutiche adatte alla somministrazione congiunta dei due farmaci sono le soluzioni iniettabili eventualmente da approntare al momento dell'uso

Le composizioni possono contenere un solvente inerte biologicamente compatibile, preferibilmente l'acqua stessa, un tamponante ed eventualmente altri additivi.

Le quantità di NAC e DOX per singola dose verranno modulate in funzione dello stato del paziente, del tipo di tumore, della gravità e dello stadio della malattia.

In generale la NAC verrà impiegata in dosi comprese tra 100 mg ed alcuni grammi, anche fino a 6 g/die in una o più somministrazioni.

La dose di DOX sarà quella sufficiente ad esprimere un effetto sinergico con la NAC e sarà nell'ordine di 1-10 mg/kg di peso corporeo, anch'essa in una o più somministrazioni. Ogni singola dose potrà contenere 1-50 mg di DOX.

La preparazione estemporanea della soluzione iniettabile può essere eseguita miscelando due opportune soluzioni dei farmaci al momento dell'uso.

Un kit adatto potrebbe comprendere le soluzioni dei due farmaci, un mezzo adatto per la loro miscelazione ed una siringa per iniezione. Alternativamente la siringa potrebbe contenere una delle due soluzioni e la miscelazione potrebbe avvenire all'interno della siringa stessa.

5

Alternativamente ancora il kit potrebbe contenere una siringa pre-riempita con la soluzione da iniettare, al fine di ridurre al minimo le operazioni da eseguire da parte del personale medico, a causa delle ben nota pericolosità della DOX.

Nell'ipotesi in cui la terapia antitumorale preveda l'uso congiunto di DOX con altri farmaci ad attività anti-tumorale quali ciclofosfammide, cis-platino, bleomicina, non si prevedono particolari controindicazioni alla somministrazione anche di NAC.

Ovviamente sarà opportuno verificare la compatibilità chimica della NAC con detti farmaci nel caso si intenda somministrare la NAC congiuntamente ad essi in un'unica forma farmaceutica insieme alla DOX.

Con lo scopo di meglio illustrare la presente invenzione vengono forniti ora i seguenti esempi.

# Esempio 1

### Materiali e metodi

## **Farmaci**

La DOX è stata usata sotto forma di prodotto commerciale iniettabile, contenente 10 mg di farmaco per fiala (Adriblastina®, Farmitalia - Carlo Erba, Milano, Italia), sciolto in acqua distillata al momento dell'iniezione. Negli esperimenti in cui era prevista la somministrazione orale, la NAC è stata usata sotto forma di prodotto commerciale contenente 200 mg di NAC per confezione (Fluimucil®, Zambon Italia, Vicenza), sciolto direttamente nell'acqua potabile dei topi. Negli esperimenti che prevedevano la somministrazione parenterale (i.p. o e.v.) di NAC, è stato utilizzato un reagente per laboratorio puro al 98% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), sciolto in tampone fosfato (PBS), pH 7,4, ed ulteriormente portato a neutralità mediante NaOH 0,1 N (esperimenti di metastasi "spontanee") oppure in NaCl 0,15 M, portando la soluzione a pH 7,0 (esperimenti di metastasi







sperimentali).

### Animali

sono stati usati in totale 385 topi adulti (Charles River, Calco, Como, Italia) di cui 196 topi nudi (CD-1)BR femmine, dell'età di 7 settimane, del peso medio di 25 g e 189 topi C57BL/6 femmine dell'età di 6-8 settimane, del peso medio di 20 g, impiegati rispettivamente negli esperimenti sulle metastasi sperimentali ed in quelli sulle metastasi "spontanee". I topi (CD-1)BR sono stati tenuti in gabbie sterili con coperchio filtrante, in numero di 3 animali per gabbia, alla temperatura ambientale di 26-28°C, con un'umidità relativa del 55%, una ventilazione di 12-15 ricambi di aria/h ed un ciclo giorno/notte di 12 ore; i topi C57BL/6 sono stati stabulati in numero di 5 animali per gabbia, alla temperatura di 25-27°C, con un'umidità relativa del 50% ed un ciclo giorno/notte di 12 ore. I topi (CD-1)BR hanno ricevuto una dieta speciale sterilizzata sotto vuoto (Mucedola S.r.l., Settimo Milanese, Milano, Italia) ed acqua potabile sterilizzata; i topi C57BL/6 hanno ricevuto una dieta standard per roditori (MIL Topi e Ratti, Morini, S. Polo d'Enza, Reggio Emilia, Italia) ed acqua potabile ad libitum per tutta la durata degli esperimenti. Negli esperimenti che prevedevano il sacrificio dei topi ad un tempo fisso, l'uccisione è avvenuta mediante anestesia con etere etilico e successiva dislocazione cervicale. La stabulazione e tutti i trattamenti degli animali sono stati eseguiti in ottemperanza delle direttive nazionali e comunitarie (D.L. 27.01.1992 N. 116; Direttiva 86/609/CEE).

#### Esperimenti di metastasi sperimentali

In questo tipo di esperimento le cellule tumorali sono state iniettate nella vena laterale della coda, in modo tale da evitare la formazione di tumori primari e realizzare direttamente la disseminazione di metastasi nei polmoni. sono state



utilizzate cellule di melanoma murino B16-F10, risospese in terreno MEM di Eagle senza siero, ed iniettate e.v. in un volume di 100 µl (5 x 10<sup>4</sup> cellule/topo). Come riportato nella Tabella 1, in cui viene indicato anche il numero di topi inclusi in ogni gruppo sperimentale, in ogni esperimento sono stati sempre previsti 4 gruppi, e cioè un gruppo di controllo (topi non trattati oppure trattati con NaCl 0,15M), un gruppo di topi trattati solo con DOX, un gruppo di topi trattati solo con NAC ed un gruppo di topi trattati con i due farmaci combinati.

In particolare, nell'esperimento #1 la DOX è stata iniettata in singola dose (5 mg/kg peso corporeo) per via i.p. 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali, mentre la NAC è stata somministrata con l'acqua potabile tutti i giorni, alla dose calcolata di 2 g/kg peso corporeo, cominciando 3 giorni prima dell'iniezione delle cellule tumorali e proseguendo per tutta la durata dell'esperimento. Nell'esperimento #2 la DOX è stata iniettata in singola dose (10 mg/kg peso corporeo) per via e.v. 3 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali, mentre la NAC è stata somministrata quotidianamente per via i.p.(1 g/kg peso corporeo), a partire da 8 ore prima dell'iniezione delle cellule tumorali e proseguendo per 8 giorni.

Nell'esperimento #3 sia la DOX che la NAC sono state iniettate per via e.v. 24 ore dopo l'iniezione di cellule tumorali, rispettivamente alle dosi di 1 mg/kg peso corporeo e 6,5 mg/kg peso corporeo; pertanto nel trattamento combinato i due farmaci sono stati iniettati dopo essere stati mescolati nella stessa siringa. Nell'esperimento #4, in cui i gruppi dei controlli e della DOX erano gli stessi dell'esperimento #3, la NAC è stata iniettata per via e.v. insieme con le cellule tumorali, sciolta nel terreno di coltura alla concentrazione 10 mM.

Nell'ambito di ogni esperimento, tutti i topi sono stati uccisi al momento della



morte "naturale" del primo animale in cui venisse riscontrata la presenza di metastasi polmonari, e cioè a distanza di 25 giorni (esperimento #1), 27 giorni (esperimenti #3 e #4) e 29 giorni (esperimento #2) dall'iniezione delle cellule tumorali. A questi tempi è stata eseguita l'autopsia. I polmoni sono stati prelevati, lavati in PBS e fissati in formalina tampanota. Il numero totale di tumori visibili sulla superficie dei polmoni è stato valutato con l'aiuto di un microscopio da dissezione.

# Esperimenti di tumorigenicità e metastasi "spontanee"

In questo tipo di esperimento, cellule di melanoma murino B16-BL6 sono state iniettate s.c. nel cuscinetto plantare della zampa posteriore destra  $(5 \times 10^5)$  cellule/topo nell'esperimento #5,  $2 \times 10^5$  cellule/topo negli esperimenti #6, #7 e #8. Con tale tecnica si forma un tumore primario nella sede di iniezione, da cui parte la disseminazione di metastasi ai polmoni.

Anche in questi esperimenti sono stati presi in considerazione 4 gruppi. In tutti gli esperimenti la NAC è stata somministrata con l'acqua potabile, alla dose di 2 g/kg peso corporeo, iniziando 48-72 ore prima dell'iniezione delle cellule tumorali e proseguendo fino al termine di ogni esperimento. Nell'esperimento #5 la DOX è stata somministrata per via i.p. (2 mg/kg peso corporeo), 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali. Negli esperimenti #6, #7 e #8 la DOX è stata invece somministrata per via e.v. (10 mg/kg peso corporeo), 24 ore (#6 e #7) o 7 giorni (#8) dopo l'iniezione delle cellule tumorali.

Negli esperimenti #5, #7 e #8 i topi sono stati tenuti fino a morte spontanea, in modo da avere indicazioni anche per quanto riguarda l'effetto dei trattamenti sulla sopravvivenza. Sia i tumori primari (frequenza e peso) che le metastasi polmonari (frequenza e numero) sono stati pertanto valutati al momento della morte.



Nell'esperimento #6 si è invece proceduto, 4 settimane dopo l'iniezione delle cellule tumorali, alla rimozione della zampa interessata dal tumore primario. Dopo altre 4 settimane gli animali sono stati uccisi, i tumori che avevano recidivato nel moncone della zampa sono stati escissi e pesati, e le metastasi polmonari sono state contate.



# Analisi statistica

In ogni esperimento è stata verificata la significatività delle eventuali variazioni dei parametri esaminati nei topi trattati singolarmente con DOX oppure con NAC rispetto ai controlli. Inoltre gli effetti del trattamento combinato sono stati valutati sia rispetto ai controlli che rispetto ad ogni trattamento singolo.

La significatività delle variazioni di frequenza di topi portatori di tumore primario, recidiva locale o metastasi polmonari è stata valutata mediante il test esatto di Fisher. La significatività delle variazioni del peso medio dei tumori primari e delle recidive locali, del numero medio di metastasi polmonari e dei giorni medi di sopravvivenza è stata valutata sia mediante test t di Student che mediante test non parametrico U di Mann-Whithney. Inoltre negli esperimenti #7 e #8 la sopravvivenza dei topi nell'ambito di ogni gruppo sperimentale è stata confrontata quotidianamente mediante analisi del  $\chi^2$ .

### Risultati

## Metastasi sperimentali

Sono stati eseguiti quattro esperimenti, due dei quali parzialmente sovrapponibili (#3 e #4) allo scopo di valutare gli effetti individuali e combinati di NAC e DOX sull'induzione di metastasi sperimentali. In tutti gli esperimenti sono state iniettate e.v. 5 x 10<sup>4</sup> cellule di melanoma murino B16-F10 in topi nudi femmine (CD-1)BR. Quando si è verificata la prima morte spontanea, tutti gli animali nell'ambito dell'esperimento sono stati sacrificati e sono state contate le metastasi polmonari. I



risultati di questi esperimenti sono riassunti nella Tabella 1.

Nell'esperimento #1 la DOX è stata somministrata in una singola iniezione i.p. (5 mg/kg peso corporeo) 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali. La NAC è stata somministrata quotidianamente con l'acqua potabile (2 g/kg peso corporeo), iniziando 3 giorni prima dell'iniezione delle cellule tumorali e continuando fino alla fine dell'esperimento. In queste condizioni, in confronto ai topi di controllo iniettati con le cellule tumorali ma senza ulteriori trattamenti, la DOX e la NAC hanno diminuito la molteplicità delle metastasi polmonari rispettivamente di 4,1 volte ed 1,3 volte. Tale diminuzione non è risultata tuttavia statisticamente significativa. Il trattamento combinato ha diminuito le metastasi polmonari di 5 volte, con una differenza rispetto ai controlli prossima alla soglia di significatività statistica. Nell'esperimento #2 la DOX è stata somministrata in una singola iniezione e.v. (10 mg/kg peso corporeo) 3 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali. Questo trattamento ha causato una diminuzione significativa sia delle frequenza di topi affetti da metastasi (dal 66,7% al 33,3%) sia del numero medio di metastasi per animale, che è stato diminuito di 17,4 volte. La NAC, somministrata quotidianamente i.p. (1 g/kg peso corporeo), iniziando 8 ore prima dell'iniezione delle cellule tumorali e continuando per gli 8 giorni successivi, non ha modificato la frequenza di animali con metastasi ed ha addirittura aumentato la loro molteplicità, ma non in misura significativa. La combinazione dei due farmaci ha prodotto effetti protettivi molto marcati. Infatti, la frequenza dei topi con metastasi è scesa al 6,7%, una diminuzione che è risultata non solo altamente significativa nei confronti sia dei controlli che dei topi trattati solo con NAC, ma si è anche avvicinata al

A causa del potente effetto osservato con la DOX nell'esperimento #2, nei

livello di significatività nei confronti dei topi trattati solo con DOX.



successivi esperimenti (#3 e #4) questo farmaco è stato somministrato e.v. ad una dose 10 volte minore (1 mg/kg peso corporeo), 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali. In queste condizioni la DOX è risultata quasi del tutto inefficace nel modulare l'induzione di metastasi polmonari.

Nell'esperimento #3 la NAC è stata somministrata e.v. a basso dosaggio (6,4 mg/kg peso corporeo) 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali, causando una diminuzione apprezzabile (2,8 volte) ma non significativa delle metastasi. La combinazione dei due farmaci, mescolati insieme nella stessa iniezione e.v. 24 ore dopo le cellule tumorali, ha diminuito la frequenza dei topi affetti da metastasi (dal 63,6% al 36,4%, non significativo) ed ha ridotto in maniera drastica il numero delle metastasi, e precisamente di 61,3 volte rispetto ai controlli (significativo), di 48,7 volte rispetto ai topi trattati solo con DOX (significativo) e di 32,8 volte rispetto ai topi trattati solo con NAC (non significativo).

Nell'esperimento #4 la NAC è stata sciolta in concentrazione 10 mM nel terreno di coltura delle cellule tumorali. Questo ha causato una diminuzione significativa delle metastasi (14,7 volte) rispetto ai controlli iniettati con cellule tumorali non trattate. La successiva iniezione di DOX dopo 24 ore che, come già ricordato, era di per sé inefficace, ha determinato un notevole effetto sinergistico. Infatti la diminuzione del numero di metastasi è stata pari a 61,3 volte rispetto ai controlli, 48,7 volte rispetto alla DOX da sola e 4,2 volte rispetto alla NAC da sola. tutte queste differenze sono risultate statisticamente significative.

## Tumorigenicità e metastasi "spontanee"

Quattro ulteriori esperimenti, due dei quali parzialmente sovrapponibili (#7 e #8), sono stati designati allo scopo di valutare gli effetti di NAC e DOX, individualmente o in combinazione, sulla formazione di tumori primari locali e sulla



successiva disseminazione di metastasi polmonari. Topi C57BL/6 femmine hanno ricevuto una singola iniezione s.c. di 2-5 x 10<sup>5</sup> cellule/topo nel cuscinetto plantare della zampa posteriore destra. In tre esperimenti (#5, #7 e #8) gli animali sono stati tenuti fino a morte spontanea, quando sono stati registrati il peso dei tumori primari ed il numero delle metastasi. Nell'esperimento #6 la zampa è stata amputata 4 settimane dopo l'iniezione delle cellule tumorali ed il tumore primario è stato escisso e pesato. Dopo ulteriori 4 settimane tutti gli animali sono stati sacrificati e le metastasi polmonari sono state contate. Inoltre, in un certo numero di animali sono state osservate recidive locali in corrispondenza del moncone residuo.

L'esperimento #5 era una prova pilota con un limitato numero di animali. La DOX è stata somministrata i.p. (2 mg/kg peso corporeo) 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali e la NAC è stata somministrata con l'acqua potabile (2 g/kg peso corporeo) iniziando 48 ore prima dell'iniezione delle cellule tumorali e continuando fino alla fine dell'esperimento. La sopravvivenza dei topi non è stata modificata da questi trattamenti. L'iniezione di DOX non ha diminuito in misura significativa il peso dei tumori primari, mentre ha ridotto significativamente (6 volte) il numero delle metastasi polmonari. Il peso dei tumori primari è stato più che dimezzato nei topi trattati sono con NAC, riduzione che tuttavia non è risultata statisticamente significativa, mentre il numero delle metastasi è risultato significativamente più basso (7,2 volte) rispetto ai controlli. La combinazione dei trattamenti con DOX e NAC è stata molto efficace nell'inibire in misura significativa la formazione sia dei tumori primari (4 volte) che di metastasi polmonari (10,7 volte).

Nell'esperimento #6 i trattamenti erano come descritto per l'esperimento #5, eccetto che la dose di DOX è stata portata a 10 mg/kg peso corporeo. Il peso dei tumori primari 4 settimane dopo l'iniezione delle cellule tumorali è risultato



piuttosto basso e non influenzato dai trattamenti singoli con DOX o NAC. Il trattamento combinato ha invece prodotto un'inibizione significativa e marcata della frequenza dei topi affetti da tumore e ancor più del peso dei tumori primari, non solo rispetto ai controlli ma anche rispetto ad ognuno dei due trattamenti farmacologici individuali. Analogamente, sia la frequenza che il peso delle recidive locali sono risultati più bassi nei topi che avevano ricevuto il trattamento combinato rispetto ai topi di controllo ed ai topi trattati individualmente con i due farmaci. Addirittura nessuno dei 12 topi che avevano ricevuto il trattamento combinato ha sviluppato metastasi polmonari, ciò che ha determinato un crollo significativo della loro frequenza in confronto ad ognuno degli altri tre gruppi e del loro numero in confronto ai controlli ed ai topi trattati solo con DOX. La differenza con i topi trattati sono con NAC non ha invece raggiunto la soglia della significatività statistica a causa di una diminuzione di 1,6 volte (non significativa) del numero di metastasi polmonari nei topi trattati con questo tiolo.





La NAC p.o. (2 g/kg peso corporeo) ha aumentato in maniera notevole la sopravvivenza dei topi negli esperimenti #7 e #8, come verificato sia valutando i tempi medi di sopravvivenza in confronto ai controlli (Tabella 2) sia confrontando quotidianamente le curve di sopravvivenza in questi due gruppi. In minor misura, anche la DOX e.v. (10 mg/kg peso corporeo) ha prolungato la sopravvivenza quando somministrata 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali. Questo trattamento ha determinato un miglioramento significativo della curva di sopravvivenza, soprattutto nei primi 50 giorni, ed ha aumentato significativamente il tempo medio di sopravvivenza (Tabella 2, esperimento #7). Il trattamento con DOX 7 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali non ha invece influenzato le curve di sopravvivenza né il tempo medio di sopravvivenza (Tabella 2, esperimento



#8). Il trattamento combinato con NAC e DOX non ha ulteriormente aumentato la sopravvivenza rispetto al trattamento singolo con NAC. Tuttavia è degno di nota il fatto che i trattamenti combinati hanno migliorato la sopravvivenza rispetto ai trattamenti singoli con DOX, somministrata 24 ore oppure 7 giorni dopo iniezione delle cellule tumorali. E' anche notevole il fatto che la combinazione di NAC con DOX (dopo 7 giorni) abbia aumentato il tempo di sopravvivenza rispetto ai controlli, mentre il singolo trattamento con DOX è risultato inefficace (Tabella 2, esperimento #8).

Nei confronti fra i gruppi esaminati negli esperimenti #7 e #8 è necessario tener presente che i tumori primari e le metastasi polmonari sono stati valutati in ogni animale al momento della morte. Di conseguenza, nei casi in cui i tempi di sopravvivenza erano aumentati significativamente, anche dati di cancerogenicità simili riflettono uno sviluppo più lento delle cellule tumorali. A maggior ragione, gli effetti protettivi sono ancora più importanti di quanto deducibile dai confronti statistici. In questa luce, le diminuzioni pur non significative del peso dei tumori primari, rispetto ai controlli, sono degne di nota nei gruppi di topi trattati con NAC, DOX dopo 24 ore o con la combinazione di NAC con ognuno dei due trattamenti con DOX, dal momento che il tempo di morte è stato significativamente ritardato in tutti questi gruppi. Allo stesso modo, ancora più rimarchevoli sono da considerare le inibizioni significative sia della frequenza (4,8 volte) che del numero di metastasi polmonari (2,1 volte) nei topi trattati con NAC p.o. Un'ulteriore inibizione della molteplicità delle metastasi polmonari è stata registrata nei topi trattati sia con NAC che con DOX 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali. In questo gruppo il numero di metastasi è risultato significativamente più basso in confronto non solo ai controlli (12,7 volte) ma



anche ai topi trattati solo con DOX (14,4 volte), ed è stata notevole seppure non statisticamente significativa nei confronti dei topi trattati solo con NAC (5,9 volte).

Commenti sul sinergismo fra NAC e DOX

Nei quattro studi sulle metastasi sperimentali i trattamenti variavano per quanto riguarda la dose di DOX e la sua via di somministrazione (i.p. oppure e.v.) così come per la dose di NAC, la sua via di somministrazione (p.o. oppure e.v.) ed i tempi di trattamento.

Il trattamento singolo con DOX ha ridotto in misura significativa il numero di metastasi polmonari solo quando iniettata e.v. alla dose di 10 mg/kg peso corporeo.

Il trattamento singolo con NAC ha inibito significativamente tale parametro solo quando aggiunta al terreno in cui erano risospese le cellule tumorali al momento della loro iniezione e.v. nei topi. Questo risultato conferma, anche da un punto di vista quantitativo, le conclusioni di un precedente esperimento di caratteristiche simili [Albini A. et al., Int. J. Cancer, 61, 121 (1995)].

Il trattamento combinato con i due farmaci ha invece causato una diminuzione significativa delle metastasi polmonari in tutti gli esperimenti (solo nell'esperimento #1 la diminuzione è stata vicina alla soglia di significatività statistica). In particolare, nell'esperimento #1, l'unico in cui la DOX è stata somministrata i.p., l'efficacia del trattamento combinato è stata pressappoco additiva rispetto ai trattamenti singoli. Infatti la riduzione del numero di metastasi rispetto ai controlli non trattati è stata di 5,0 volte con i due farmaci combinati, 4,1 volte con la sola DOX ed 1,3 volte con la sola NAC. Negli altri 3 esperimenti, in cui l'agente citotossico è stato somministrato e.v., l'effetto combinato non solo è risultato più che additivo ma addirittura molto più che moltiplicativo. Infatti, la riduzione del



numero di metastasi nei topi trattati con i due farmaci combinati, con la sola DOX e con la sola NAC è stata rispettivamente pari a 174,3, 17,4 e 0,5 volte nell'esperimento #2, 90,5, 1,3 e 2,8 volte nell'esperimento #3 e 61,3, 1,3 e 14,7 volte nell'esperimento #4.

Nei quattro studi di tumorigenicità e metastasi "spontanee" la NAC è sempre stata data p.o. ed alla stessa dose (2 g/kg peso corporeo), mentre per la DOX sono stati fatti variare dose (da 2 a 10 mg/kg peso corporeo), via di somministrazione (i.p. o e.v.) e tempo (1 o 7 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali).

Il trattamento singolo con DOX ha diminuito in misura significativa il numero di metastasi polmonari solo nell'esperimento #5, alla dose di 2 mg/kg peso corporeo per via i.p.

Il trattamento singolo con NAC, a conferma dei risultati ottenuti in un precedente studio [Albini A. et al., Int. J. Cancer, 61, 121 (1995)], ha avuto effetti protettivi significativi negli esperimenti in cui i topi sono stati tenuti fino a morte spontanea (#5, #7/8). In particolare, sia nell'esperimento #5 che nell'esperimento #7/8 (il gruppo NAC era comune ai due esperimenti), la NAC ha inibito significativamente il numero di metastasi polmonari e nell'esperimento #7/8 ha anche ridotto significativamente la frequenza di topi affetti da metastasi. Inoltre, nell'esperimento #7/8 la NAC ha aumentato notevolmente i tempi di sopravvivenza degli animali. Il trattamento combinato con DOX ha avuto effetti più che moltiplicativi nell'esperimento #6, in cui sono stati scelti tempi fissi per valutare in tutti gli animali i tumori primari (4 settimane), le recidive locali e le metastasi polmonari (8 settimane). Infatti, la riduzione rispetto ai controlli nei topi trattati con i due farmaci combinati, con la sola DOX e con la sola NAC è stata pari a 7,3, 1,4 e 1,0 volte per quanto riguarda il peso dei tumori primari, 12,5, 1,1 e 0,9 volte per

quanto riguarda il peso delle recidive locali, e ∞ (non vi era neppure una metastasi fra i topi che avevano ricevuto il trattamento combinato), 0,7 ed 1,6 volte per quanto riguarda il numero di metastasi polmonari. Nell'esperimento #5 le riduzioni sono state pari a 4,0, 1,3 e 2,1 volte per quanto riguarda il peso dei tumori primari (effetto poco più che additivo), e pari a 10,7, 6,0 e 7,2 volte per quanto riguarda il numero di metastasi polmonari (effetto poco meno che additivo). L'associazione della NAC con DOX somministrata 7 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali (esperimento #8), non è risultata particolarmente efficace. L'associazione della NAC con DOX, somministrata 24 ore dopo l'iniezione delle cellule tumorali (esperimento #7), ha invece prodotto effetti più che moltiplicativi sulla riduzione delle metastasi polmonari (12,7, 0,9, e 2,1 volte rispettivamente nei topi trattati con entrambi i farmaci, con la sola DOX e con la sola NAC).









Tabella 1. Metastasi sperimentali in topi nudi femmine (CD-1)BR trattati con un'iniezione e.v. di cellule B16-F10 (5x10<sup>4</sup> cellule/topo)

			E	pi con	Topi con metastasi (n.)	(1)
Esperimento   Ulteriori t	Ulteriori trattamenti (a)	Toni				Matastasti nolmanari (n.)
•		E E	0	0 1-10	11-50 >51	
#	Controlli (non trattati)	2	0	~		
	(manning morn morn)	2	>	١	J	54,2 ± 23,1
	DOX (5 mg/kg i.p., +24h)	=	7	4	5 0	131+116
	NAC (2 g/kg p.o., -3/+25 gg.)	12	0	m	7	10,1 - 11,0
	DOX+NAC	2	• •	· 4	. 4	$42.1 \pm 15.8$
	NAME AND A	71	7	<b>^</b>	n	10,9 ± 13,6
#2	Controlli (NaCl 0,15 M i.p.)	15	5	7	2 1	122+66
	DOX (10 mg/kg i.v., +3 gg.)	15	10	<b>~</b>	0 0	0.4+0.3
	NAC (1 g/kg i.p., -8 h/+8 gg.)	15	5	4	· (r)	C, - ', O
	DOVENIAC	1				$25,1 \pm 10,2$
	DOATINAC	<u>-</u>	<b>†</b>	<b>-</b>	o o	$0.07 \pm 0.07$
#3	Controlli (NaCl 0,15 M e.v.)	=	4	2	1 4	368+146
	DOX (1 mg/kg e.v., +24 h)	=	m	ς.	0	20,5 ± 13,5
	NAC (6.4 mg/kg e.v. +24 h)	=	~	C		7,57 1 13,1
	DOX + NAC	: =	, [	1 -	- c	$13.1 \pm 8.9$
	DOA 1 MAC	-	,	4	0	0,4 ± 0,2
#4	Controlli (NaCl 0, 15 M i.p.)	=	4	2	1 4	368+146
	DOX (1 mg/kg i.v., +24 h)	=	m	ς.	0	2004 13.4
	NAC (10 mM nel terreno di coltura)	_	_	۲		1,61 ± 2,62
	TATE (10 mm) nel terreno di contura)	= ;	<b>†</b> !	_	) )	2.5 ± 0.7
	DOX + NAC	=	_	4	0	
						~ = +00 -

Note alla tabella (a) In ciascun esperimento il trattamento DOX + NAC si intende effettutato con le stesse dosi dei singoli farmaci nel medesimo esperimento



Tabella 2. Tumorigenicità e metastasi "spontanee" in topi femmine C57BL/6 trattati con un'iniezione s.c. di cellule B16-BL6 (2.5 x 10<sup>5</sup> cellule/topo)

			Тито	Tumori primari	Recidi	Recidive locali	Metastas	Metastasi polmonari	Soprovvivenza
	17			***************************************	*****	******************		****************	(giorni)
Esperimento	Ulteriori trattamenti(a)	Top	Frequenza	Peso g	Frequenza	Peso g	Frequenza	Ë	!
		Œ)	(%)	(media ± ES)	8)	(media ± ES)	(%)	(media ± ES)	(media ± ES)
£	Controlli	7	100,0	4,0 ± 1,1	•		83.3	60.0 + 18.8	346+40
	DOX (2 mg/kg i.p., +24h)	ည	100,0	$3,0 \pm 1,3$	•	•	100.0	10.0 + 6.4	312+47
	NAC (2 g/kg p.o., -48 h/fine)	9	100,0	$1,9 \pm 0,4$	•	•	83,3	8,3 ± 6,8	32.2 + 2.5
	DOX + NAC	5	100,0	$1,0 \pm 0,5$	•	•	40,0	5,6± 7,7	33.6 ± 4.4
¥	Controlli	13	100,0	$0,29 \pm 0,06$	61,5	2,5 ± 0,7	61,5	21.2 ± 2.2	56 (sacrificio)
	DOX (10 mg/kg i.v., +24h)	<del></del>	92,3	0,21 ± 0,05	69,2	$2,2 \pm 0,7$	75,0		56 (sacrificio)
	NAC (2 g/kg p.o., -48 h/56 gg.)	<del>ا</del>	93,3	$0,28 \pm 0,04$	53,3	$2.8 \pm 0.8$	45,5	12.9 ± 7.8	56 (sacrificio)
	DOX + NAC	12	33,3	$0.04 \pm 0.02$	8,3	0,2 ± 0,2	0		56 (sacrificio)
£#	Controlli	13	100,0	3,0 ± 0,9			72,7	20,3 ± 8.8	45.2 + 2.1
	DOX (10 mg/kg i.v., +24h)	55	100,0	2,2±0,6	•	•	6'9/	•	$51.3 \pm 1.9$
	NAC (2 g/kg p.o., -72 h/line)	4	100,0	1,9 ± 0,6	•	•	18,2	9,5 ± 8,3	$60.1 \pm 3.7$
	DOX + NAC	15	100,0	$2,0 \pm 0,5$	•	1	53,8		56,9 ± 3,4
<b>9</b>	Controlli	13	100,0	$3.0 \pm 0.9$	-	-	72,7	20,3 ± 8,8	45,2 ± 2,1
	DOX (10 mg/kg i.v., +7 gg.)	5	100'0	2,3 ± 0,6	•	ı	9'69		49,0 ± 2,8
	NAC (2 g/kg p.o., -72 h/fine)	4	100,0	1,9 ± 0,6	•	•	18,2		$60,1 \pm 3,7$
	DOX + NAC	14	100,0	2,3 ± 0,7	•	•	20'0		58,1 ± 2,9

Note alla tabella (a) In ciascun esperimento il trattamento DOX + NAC si intende effettutato con le stesse dosi dei singoli farmaci nel medesimo esperimento



# Esempio 2

# Soluzione iniettabile contenente sia NAC che DOX

Una soluzione di DOX viene preparata per aggiunta di acqua distillata ad una fiala contenente 10 mg di DOX.

Una soluzione di NAC viene preparata sciogliendo 64 mg di NAC in una soluzione tampone fosfato a pH 7,4.

La soluzione viene portata a neutralità con NaOH 0,1N.

Le due soluzioni vengono aspirate in una siringa e miscelate, ottenendo una soluzione pronta per l'uso.



# Rivendicazioni

- 1) Una composizione farmaceutica contenente N-acetil-cisteina e Doxorubicina in quantità efficaci nel manifestare un effetto sinergico nell'inibizione della formazione di metastasi tumorali.
- 2) Un kit comprendente N-acetil-cisteina e Doxorubicina in quantità sinergisticamente efficaci nell'inibizione della formazione di metastasi tumorali nonché un mezzo per la loro somministrazione.
- 3) Un processo per la preparazione di una composizione farmaceutica contenente N-acetil-cisteina e Doxorubicina per l'inibizione della formazione di metastasi tumorali. This was a second
- 4) Una composizione secondo la rivendicazione 1 in cui la N-acetil-cisteina è contenuta in quantità comprese tra 100 mg e 6 g.
- 5) Una composizione secondo la rivendicazione 1 in cui la Doxorubicina è contenuta in quantità comprese tra 1 e 50 mg.
- 6) Un kit secondo la rivendicazione 2 in cui la N-acetil-cisteina è contenuta in quantità comprese tra 100 mg e 6 g.
- 7) Un kit secondo la rivendicazione 2 in cui la Doxorubicina è contenuta in quantità comprese tra 1 e 50 mg.
- 8) Un processo per la preparazione di una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3 in cui la N-acetil-cisteina è contenuta in quantità comprese tra 100 mg e 6 g.
- 9) Un processo per la preparazione di una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3 in cui la Doxorubicina è contenuta in quantità comprese tra 1 e 50 mg.

Stefano Panossian

N. iscriz. Albo 282

